

23155



Pat. App. 10/520,999

TRANSLATOR'S CERTIFICATE


I, Andrew Wilford, a citizen of the United States of America,  
residing in Yonkers, New York, state that:

I am familiar with the English and German languages;

I have read a copy of the German-language documents PCT  
application PCT/DE2003/002290 published 22 January 2004 as  
WO/2004/007705 and the hereto attached certified copy of German  
patent application 102 31 297.4;

The German-language texts of both documents are identical.

The English-language text filed 7 January 2005 is an accurate  
translation of these German-language documents.

  
\_\_\_\_\_  
Andrew Wilford

I hereby certify that I have deposited this correspondence with the US Postal Service as first-class or, if a mailing-label number is given below, as express mail addressed to Comm. of Patents, Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on the below-given date.

**AUG - 1 2008**

Date **EM130045025**

Express mail label number

Signature \_\_\_\_\_

**Enclosure: Cert. Prior. Doc.**



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 31 297.4

**Anmeldetag:** 10. Juli 2002

**Anmelder/Inhaber:** Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich/DE;  
Amino GmbH, 38373 Frellstedt/DE.

Erstanmelder: Forschungszentrum Jülich GmbH,  
52428 Jülich/DE

**Bezeichnung:** Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codie-  
rend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte  
Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

**IPC:** C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind die richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Juni 2005  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag



W. Müller

## B e s c h r e i b u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

---

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin.

5

Die Aminosäure L-Serin findet in der Nahrungsmittel-, Futtermittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Humanmedizin Anwendung. Darüber hinaus dient sie als Baustein für die Synthese weiterer industriell verwertbarer Produkte, wie z. B. L-Tryptophan aus Indol und L-Serin.

10

Es ist bekannt, dass L-Serin durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien hergestellt werden kann. So ist z. B. ein Stamm von *Corynebacterium glycinophilum* in der Lage, L-Serin aus Glycin und Kohlenhydraten zu bilden (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada K und Okumura S (1972) Journal of General Applications in Microbiology 18: 365). An der Umsetzung von Glycin zu L-Serin ist hier das Enzym L-Serin-Hydroxymethyltransferase beteiligt (Kubota K und Yokozeki K (1989) Journal of Fermentation and Bioengineering, 67(6):387-390). Die verwendeten Stämme weisen darüber hinaus einen verminderten L-Serin-Abbau auf, der auf eine Ver-

15

20

25

ringerung der Aktivität des Enzyms L-Serin-Dehydratase zurückzuführen ist (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) Journal of General Applications in Microbiology, 17: 167-168; Kubota K (1985) Agricultural Biological Chemistry, 49:7-12).

Weiterhin wird L-Serin fermentativ aus Methanol und Glycin unter Zuhilfenahme methyilotropher Bakterien, wie z. B. *Hyphomicrobium* Stämmen, produziert (Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shiamo M, Miyata A und Tanabe T (1993) Applied Microbiology and Biotechnology, 39: 427-432). In beiden Fällen muss die Aminosäure Glycin als Vorstufe für die Bildung der Aminosäure L-Serin eingesetzt werden.

Ferner sind coryneforme Bakterien bekannt, die L-Serin direkt aus Kohlenhydraten, ohne zusätzliche Beigabe weiterer Vorstufen produzieren können. Diese Stämme, die zu der Gattung *Corynebacterium glutamicum* gehören, weisen sich dadurch aus, dass sie z. B. resistent gegen die L-Serin-Analoga Serin-Hydroxamat und  $\beta$ -Chloroalanin sind und durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurden (Yoshida H und Nakayama K (1974) Nihon-Nogei-Kagaku-kaishi 48: 201-208).

Darüber hinaus sind *Brevibacterium flavum* Stämme bekannt, die durch ungerichtete Mutagenese Defekte im L-Serin-Abbau aufweisen, eine erhöhte Aktivität der durch *serA* kodierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase besitzen, und die aus *Escherichia coli* stammenden Gene *serB* und *serC* überexprimieren (EP0931833A2). Das hierbei verwendete deregulierte *serA*-Gen wurde durch ungerichtete Mutagenese gewonnen und unterscheidet sich vom Wild Typ Gen nur durch einen einzigen Basenaustausch. Die Expression dieses Gens beinhaltet den Nachteil,

dass es leicht zu einer Reveritierung und damit zur Zurückführung in den regulierten Zustand kommen kann.

Ein Nachteil bisher bekannter 3-Phosphoglycerat-

5 Dehydrogenasen liegt in ihrer Feedback Inhibition durch L-Serin, wodurch beispielsweise die Produktivität der mikrobiellen Herstellung von L-Serin verringert wird. Die Region, die für diese Regulation durch L-Serin verantwortlich ist, ist der C-Terminus des Proteins. Aus  
10 WO 93/12235 ist eine DNA bekannt, die für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus E. coli codiert, deren C-Terminus zu 25% verändert, komplett deletiert oder in den in einem bestimmten Bereich eine Insertion durchgeführt wurde, so dass eine geringere Inhibition  
15 durch L-Serin zu verzeichnen war. Diese 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wies jedoch nur noch eine geringe Aktivität auf. Eine verbesserte L-Serinproduktion wurde mit der deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nicht nachgewiesen.

20 Die Wild Typ *serA* Sequenz ist allgemein bekannt und kann den dem Fachmann bekannten Datenbanken oder dem beigefügten Sequenzprotokoll gemäß SEQ ID No. 6 entnommen werden.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Maßnahmen zur Ver-  
25 fügung zu stellen, mit denen die zuvor genannten Nachteile beseitigt werden können und die zu einer verbesserten Produktion von L-Serin oder davon ableitbaren Stoffwechselprodukten wie z. B. Tryptophan führen. Es ist somit Aufgabe der Erfindung Nukleinsäuren, codierend für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden  
30 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen eine verringerte Feed-

back Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweist. In diesem Zusammenhang ist es weiterhin Aufgabe der Erfindung eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase sowie Mikroorganismen bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen bzw. Mikroorganismen mit einer 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, eine verringerte Feedback Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweisen. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin bereitzustellen.

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 9 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 9 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 10 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 10 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 11 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 11 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 20 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 20 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 26 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 26 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 27

erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 27 angegebenen Merkmale.

Mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden oder gentechnisch nicht veränderten Nukleinsäuren bzw. Enzymen keine bzw. eine verringerte L-Serin Feedback Inhibierung unter Erhalt der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität aufweist.

10 Diese Eigenschaft wird im Folgenden unter der Bezeichnung „dereguliert“ zusammengefasst. Weiterhin ist es möglich Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine L-Serinproduktion mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten möglich ist.

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

20 Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, im Folgenden mit PGD bezeichnet, enthaltend eine Gensequenz *serA* gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder ein Allel, Homolog oder

25 Derivat dieser Nukleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nukleotidsequenzen. Die Nukleinsäure gemäß SEQ ID No 1, die für eine PGD mit einer Deletion von 197 Aminosäuren im C-Terminus codiert, hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

30

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevor-



zugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum isoliert werden. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind, Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 sowie Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806 oder auch Brevibacterium flavum ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind, Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomycrobium, Alcaligenes oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

- 15 Unter einer Nukleinsäure oder einem Nukleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifizierte oder artifizielle Nukleotide enthalten kann.
- 20 Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

- Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell Äquivalente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nukleotidsequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerierung des genetischen Codes bedingt noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den

Kodongebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nukleotidsequenzen.

- Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotide.
- Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen, die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konservierter Aminosäuren führen können, welche aber zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nukleotidsequenz, die auf Proteinebene den N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.
- Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nukleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nukleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder

durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

10 Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziell ähnliche Nukleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung (Bindung) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 20 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfaßt erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'-oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'-oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur  
enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen  
Nukleotidsequenzen codierend für eine deregulierte PDG  
sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Se-  
5 quenzen, welche die Expression der codierenden Sequen-  
zen in der Wirtszelle steuern.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen  
Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor be-  
10 schriebenen Art codierend für eine deregulierte PDG,  
mit diesen operativ verknüpfte regulative Nukleotidse-  
quenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion  
transformierter Wirtszellen, für die Replikation  
innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das  
15 entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten  
Art enthalten.

Als Vektoren eignen sich solche, die in coryneformen  
Bakterien repliziert werden wie z. B. pZ1 (Menkel E,  
20 Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688), pEKEx2 (Eikmanns et al., *Gene* 102: 93-98 (1991) , pVWEx oder pXMJ19. Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden.  
Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung je-  
25 doch nicht limitierend.

Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer  
synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise  
30 mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt coryneformen Bakterien zu  
amplifizieren und isolieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den

5 erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich

10 handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu

15 findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im

20 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260).

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine deregulierte PGD oder ein Teil davon, kodiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder deren Variationen der zuvor beschriebenen Art. Die vorliegende Erfindung betrifft e-

30 benso eine deregulierte PGD mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 7, 8, 9, 10 oder 11 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon oder Mischungen daraus. Als besonders ge-

eignet hat sich eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 7 erwiesen.

Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder ver-  
5 gleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme  
10 zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen  
15 nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide mit der Funktion einer deregulierten PGD, die in ihrer Aminosäuresequenz derart verändert sind, dass sie ge-  
20 genüber regulatorisch wirkenden Verbindungen, beispielsweise die sie in ihrer Aktivität regulierenden Stoffwechsel-Endprodukte (L-Serin) desensitiv sind (feedback-desensitiv).

25 Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium  
30 glutamicum stammen. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, sowie Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806 oder auch Brevibacterium

flavum ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomicrobium, Alcaligenes  
5 oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die  
10 Übertragung wenigstens einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder eines Teils davon codierend für eine deregulierte PGD, ein Allel, Homolog oder Derivat davon in ein Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung eines erfindungsgemäßen Genkonstrukts oder Vektors in ein Wirtssystem ein. Diese Übertragung von DNA  
15 in eine Wirtszelle erfolgt nach gentechnischen Methoden. Als bevorzugtes Verfahren sei hier die Transformation und besonders bevorzugt die Übertragung von DNA durch Elektroporation genannt.

20

Als besonders geeignet hat sich ein homologes Wirtssystem erwiesen. Unter einem homologen Wirtssystem sind Mikroorganismen zu verstehen, die alle einer verwandten Familie angehören. Erfindungsgemäß sind hierunter coryneforme Bakterien zu verstehen, in die die erfindungsgemäß aus coryneformen Bakterien isolierten Nukleinsäuren eingebracht werden. Ein aus einer erfolgreich durchgeführten Nukleinsäureübertragung resultierender transformierter Mikroorganismus unterscheidet sich so-  
25 mit von dem entsprechend nicht transformierten Mikroorganismus dadurch, dass er zusätzliche Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Art enthält und entsprechend zur Ausprägung bringen kann. Stellvertretend für ein geeigne-

30

tes homologes Wirtssystem sei das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* und bevorzugt der Stamm ATCC 13032 genannt. Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein Komplexmedium wie z . B. LB Medium (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Clonin : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989)) oder auch ein Mineralsalzmedium, wie z. B. CGXII-Medium (Keilhauer, C. et al 1993, J. Bacteriol., 175:5593-5603) geeignet. Nach entsprechender Kultivierung kann die Bakteriensuspension geerntet und zur weiteren Untersuchung, beispielsweise zur Transformation oder zur Isolierung von Nukleinsäuren nach gängigen Methoden eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise kann analog auch auf andere coryneforme Bakterienstämme angewendet werden. Dabei werden als Wirtssysteme Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* bevorzugt. Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* wird besonders die Art *Corynebacterium glutamicum* und innerhalb der Gattung *Brevibacterium* besonders die Art *Brevibacterium flavum* bevorzugt. Zu den Vertretern dieser Gattungen zählen zum einen Stämme, die in ihren Eigenschaften als Wild Typ charakterisiert sind. Hier sind beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 und *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020 zu nennen.

Darüber hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch Bakterienstämme als Wirtssystem ein, die sich als L-Serin produzierende Mutanten oder Aminosäureprodukti-



onsstämme auszeichnen. Diese können z. B. ausgehend von Wildtypstämmen durch klassische (chemische oder physikalische) oder gentechnische Methoden hergestellt werden. Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Stämme  
5 sind u. a. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21586, *Corynebacterium glutamicum* KY 10150, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 $\Delta$ panBC und *Brevibacterium ketoglutamicum* ATCC 21222. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme geeignet, die dem Fachmann aus mikrobiellen Herstellungsverfahren bekannt sind, wie  
10 z. B. Enterobakterien, Bacillaceen oder Hefe-Arten. Die vorliegende Erfindung wird durch die ausgewählten Beispiele an Mikroorganismen näher charakterisiert, jedoch nicht limitiert.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Nukleinsäure der zuvor beschriebenen Art, welche im Vergleich zu dem  
20 entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.

Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.  
25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit der Funktion einer deregulierten PGD der zuvor beschriebenen Art, welches eine im Vergleich zu dem entsprechend  
30

nicht genetisch veränderten Mikroorganismus eine verringerte bzw. keine feedback Inhibierung durch L-Serin unter Erhalt der PGD-Aktivität aufweist. Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, daß er ein coryneformes  
5 Bakterium, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Spezies Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum ist.

10 Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer  
15 erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

20 Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von sogenannten Defekt-Mutanten des zu untersuchenden Organismus, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens  
25 oder entsprechenden Proteins aufweisen. Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der Mutante und weitgehende Wiederherstellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder  
30 Genfragmente aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus erreicht wird.

Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten ist beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B.

N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung.

5 Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder  
10 im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein  
15 Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, wobei wenigstens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, isoliert aus einem coryneformen Bakterium, in einen Wirtsorganismus übertragen und dort exprimiert werden, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des  
20 entsprechend kodierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin eingesetzt wird und das entsprechend gebildete L-Serin aus dem  
25 Kulturmedium isoliert wird.

Zur Erzielung einer erhöhten Genexpression (Überexpression) kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden. Ferner kann die Promotor- und/oder Regulationsregion und/oder die Ribosomenbindungsstelle, die  
30 sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, entsprechend so verändert werden, dass die Expression mit erhöhter Rate erfolgt. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens einge-

baut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Serin Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird  
5 ebenfalls die Expression verbessert. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Weiterhin kann auch die Aktivität des Enzyms selbst erhöht sein oder durch die  
10 Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins verstärkt werden. Alternativ kann ferner eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem  
15 bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (BioRechnology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent  
20 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et  
25 al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
30 Molekularbiologie.

Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinu-

ierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im  
fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch  
Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der  
Produktion von L-Serin kultiviert werden. Eine Zusam-  
5 menfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im  
Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in  
die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stutt-  
gart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren  
und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braun-  
10 schweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Wei-  
se den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Be-  
schreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorga-  
15 nismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General  
Bacteriology" der American Society for Bacteriology  
(Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlen-  
stoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B.  
Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melas-  
20 se, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Soja-  
Öl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren  
wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure,  
Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische  
Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese  
25 Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet wer-  
den. Als Stickstoffquelle können organische stickstoff-  
haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleisch-  
extrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl  
und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammo-  
30 niumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoni-  
umcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die  
Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung ver-  
wendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,

Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.

Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt.

Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Serin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse der L-Serin-Bildung kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben,

oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

- 5 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Serin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Vertreter coryneformer Bakterien handeln. Eine Auswahl an Ergebnissen der Fermentation ist in Tabelle 6 dargestellt. Hierbei zeichnen sich die erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine wesentlich verbesserte L-Serin-Produktion gegenüber den entsprechend nicht transformierten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, dass die Überexpression des homologen C-terminal verkürzten *serA*-Gens in *C. glutamicum* ATCC 13032DpanBCpZ1serAA197 zu einer wenigstens 40%igen Steigerung der L-Serin Akkumulation im Medium im Vergleich zu den Kontrollstämmen führt (Tab. 6). Durch die gemeinsame Überexpression weiterer Gene, die positiv auf den L-Serinbiosyntheseweg wirken, ist eine noch weitere Steigerung der L-Serin-Produktion zu erwarten.

Unter Aminosäure-Produktionsstämmen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung Corynebacterium glutamicum-  
30 Stämme oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, dass ihr Stoffwechselfluss verstärkt in die Richtung der Biosynthese von Aminosäuren

oder deren Abkömmlingen verläuft (metabolic engineering). Beispielsweise sind bei diesen Aminosäure-Produktionsstämmen ein oder mehrere Gen(e) und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und  
5 entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vor-  
liegende Erfindung umfasst hierbei sämtliche bereits bekannte Aminosäure-Produktionsstämmen, bevorzugt der  
10 Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktions-  
stämmen umfaßt, die der Fachmann in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Mikroorganismen, beispielsweise *Enterobacterien*, *Bacillaceen* oder Hefe-Arten nach gängi-  
15 gen Methoden herstellen kann.

Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide sowie einen Vergleich der Primärstruktur der PGD und mittels PCR konstruierter Allele von *serA*.

20

Es zeigt:

Fig. 1: Vergleich der Primärstruktur der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGD) aus verschiedenen Organismen; Skalierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren der corynebakteriellen PGD; N = Aminotermminus; C = Carboxyterminus; der mit einer hell grauen Fläche markierte Bereich A stellt die Nukleotid-Bindungsstelle dar;  
25 der mit einer dunkel grauen Fläche markierte Bereich B stellt die Substrat-Bindungsstelle dar; der schwarz  
30 markierte Bereich C stellt die Inhibitor-Bindungsstelle dar.



Darüber hinaus gibt es zwei weitere Gruppen von  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die exemplarisch  
durch *E. coli* (Tobey K.L. und Grant G.A., 1986, J. Bi-  
ol. Chem., 261: 12179-12183) bzw. *Thermotoga maritima*  
5 (GenBank-Accession-Nummer AE000512) vertreten sind.  
Hierbei ist das Protein des hyperthermophilen Bakteri-  
ums *T. maritima* mit einer Länge von 327 Aminosäuren am  
kürzesten, während die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase  
aus *E. coli* mit 410 Aminosäuren eine intermediäre Länge  
10 aufweist.

Fig. 2: Übersicht über die mittels PCR konstruierten  
Allele von *serA*, die für die deregulierte, C-terminal  
verkürzte PGD codieren. Gezeigt ist der *serA*-Genbereich  
15 des Wild Typs (oben) und die erfindungsgemäßen Deleti-  
onskonstrukte. Die hell, dunkel und schwarz markierten  
Bereiche entsprechen der Definition wie in Fig. 1.

Fig. 3: Plasmidvektor pZ1*serA*

20 Fig. 4: Plasmidvektor pZ1*serAA*79

Fig. 5: Plasmidvektor pZ1*serAA*188

Fig. 6: Plasmidvektor pZ1*serAA*197

Fig. 7: Plasmidvektor pZ1*serAA*205

Fig. 8: Plasmidvektor pZ1*serAA*211

25

#### Ausführungsbeispiele:

##### 1. Gezielte Deregulation der 3-Phosphoglycerat- Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

30 a) Computergestützter Aminosäuresequenz-Vergleich der  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium*

glutamicum mit 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen an-  
derer Organismen

Es wurde zunächst eine Strategie zur Konstruktion einer  
5 deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase entwi-  
ckelt. Es wurde die Sequenz des *serA*-Gens, das für die  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* ko-  
diert, aus der Patent-Datenbank verwendet (Nakagawa, S.,  
Mizoguchi, H., Ando, S., Hayashi, M., Ochiai, K., Yokoi, H.,  
10 Tateishi, N., Senoh, A., Ikeda, M. and Ozaki, A. Patent: EP  
1108790-A 7064 20-JUN-2001; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.  
(JP); Pompejus, M., Kroeger, B., Schroeder, H., Zelder, O.  
and Haberhauer, G. Patent: WO 0100843-A 167 04-JAN-2001;  
BASF AKTIENGESELLSCHAFT (DE)). Die vom *serA*-Gen (SEQ-  
15 ID-No. 12) von *Corynebacterium glutamicum* abgeleitete  
Polypeptidkette wurde dann mit entsprechenden  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus der Datenbank  
(GenBank) verglichen. Es zeigte sich, dass die  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* wie  
20 die aus *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank-Accession-  
Nummer AL123456) und einigen anderen Bakterien wie *Ba-  
cillus subtilis* (Sorokin, A., Azevedo, V., Zumstein, E.,  
Galleron, N., Ehrlich, S.D. und Serror, P. Microbiology  
142 (Pt 8), 2005-2016 (1996)) und *Aquifex aeolicus*  
25 (GenBank-Accession-Nummer AE000657) mit 530 Aminosäuren  
ausserordentlich lang ist. Zu dieser Gruppe von Enzymen  
zählen auch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus  
Tieren wie Ratte (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftin-  
gen E. und Robbi M., 1997, Biochem. J., 323:365-370)  
30 und Mensch (Cho HM, Jun DY, Bae MA, Ahn JD, Kim YH.,  
2000, Gene 245(1):193-201) sowie Pflanzen (z. B. *Arabi-  
dopsis thaliana*; Ho CL, Saito K., 2001, Amino Acids.  
20(3):243-59). Die Analyse der Röntgenstruktur des *E.*

*coli*-Enzyms ergab, dass es aus drei funktionellen Domänen besteht: einer Nukleotidbindedomäne (Aminosäure 108 bis 294) für die Bindung von NAD/H, einer zweigeteilten Substratbindedomäne (Aminosäure 7-107 und 295-336), an der das 3-Phosphoglycerat bindet, sowie einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Aminosäure 337-410), die für die allosterische Bindung des L-Serin verantwortlich ist (Schuller DJ, Grant GA, Banaszak LJ., 1995, Nature Struct. Biol. Vol 2 1:69-76). Der Aminosäuresequenzvergleich der drei 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Typen ergab, dass sie sich im Wesentlichen in der Länge der C-terminalen regulatorischen Domäne unterscheiden (Abb. 1).

Eine Clusteranalyse der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die aus vollständig sequenzierten Genomen bekannt sind, ergab, dass trotz der Unterschiede im C-Terminus alle diese Proteine zu einer Familie von Orthologen zählen, d. h. sie besitzen einen gemeinsamen evolutiven Ursprung, haben sich aber in den verschiedenen Spezies unterschiedlich entwickelt.

b) Konstruktion von Allelen des *serA*-Gens von *C. glutamicum* mittels PCR die für C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Proteine codieren

Es wurden fünf verschiedene Muteine der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugt, die am C-Terminus unterschiedlich lange Deletionen aufwiesen (Abb. 2). Die Konstruktion der Deletionsmutanten erfolgte ebenso wie die Isolierung des Wild Typ *serA*-Gens mittels PCR. Hierzu wurde ein PCR-Primer (*serA*-f: 5'-TCTAGAGCCGGAGACGTGAATAAAAT-3') erzeugt, der homolog

zu einer Region 240 bp vor dem Start-Codon des Gens war, um so den gesamten Promotorbereich zu erfassen. Dieser Primer wurde für alle Konstrukte gleichermaßen verwendet und trägt am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Xba*I. Zur Amplifikation des vollständigen *serA*-Gens wurde ein zweiter, revers-komplementärer Primer ausgewählt, der 199 bp hinter dem Stop-Codon lag und eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle trägt (*serA*-r: 5'-GGATCCGACTGGTGAGGGTCAAGTCC-3'). Das erwartete PCR-Produkt hat eine Länge von 2040 bp. Zur Erzeugung der Deletionen wurden revers-komplementäre Primer ausgewählt, die im Genbereich liegen, und alle ebenfalls eine Schnittstelle für *Bam*HI tragen. Der Primer *serA*Δ211-r (5'-GGATCCTTAACCGGAAACGTTTCACAGC3') liegt 956 bp hinter dem Start-Codon, so dass ein 1196 bp langes PCR-Produkt entsteht. Hierdurch werden die letzten 211 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase abgeschnitten. Die Deletion liegt etwa im Bereich des vermutlichen Übergangs von Substratbinde- zu regulatorischer Domäne (vergl. Abb. 1 und Abb. 2). Der Primer *serA*Δ205-r (5'-GGATCCTTACTCTTCGCCCACGCGACC3') liegt 974 bp hinter dem Start-Codon und das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von 1214 bp. Die C-terminale Deletion beträgt in diesem Fall 205 Aminosäuren und das Protein endet hinter der Aminosäure Glutamat an Position 325. Der ungerichtet erzeugte Austausch dieser Aminosäure zu Lysin führt in *C. glutamicum* zu einer Deregelung der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (EP 0 931 833). Beide Deletionen liegen in einem Bereich, in dem auch die Deletion (Δ209 Aminosäuren) des Proteins aus Ratte erzeugt wurde (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftingen E. und Robbi M., 1997, Biochem. J., 323:365-

370). Die beiden Primer *serA*Δ197-r  
(5'-GGATCCTTAAGCCAGATCCATCCACACAG3') und *serA*Δ188-r  
(5'-GGATCCTTACTTGCCAGCAAGAAGACC3') liegen 998 bp bzw.  
1025 bp hinter dem ATG und befinden sich stromaufwärts  
5 vom Übergang Substratbindedomäne zu regulatorischer Do-  
mäne in *E. coli*. Die nach PCR zu erwartenden DNA-  
Fragmente erzeugen Polypeptidketten die entsprechend um  
197 bzw. 188 Aminosäuren kürzer sind als die vollstän-  
dige 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase. Die kürzeste De-  
10 letion wird durch Primer *serA*Δ79-r (5'-  
GGATCCTTAATCCAGGCCACGGCCATT3') erzeugt und schneidet  
den Bereich von 79 Aminosäuren ab, der die größte Ähn-  
lichkeit zur regulatorischen Domäne von *E. coli* auf-  
weist (Abb.2). Zusätzlich wurde in allen revers-  
15 komplementären Primern, die zu einem verkürzten Protein  
führen sollen hinter der Schnittstelle das Stop-Codon  
TAA eingefügt.

Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von  
20 200 µM Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP,  
dTTP), je 1 µM des entsprechenden Oligonukleotids, 100  
ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum*  
ATCC13032, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6  
Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-  
25 Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Ro-  
che Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Ther-  
mocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA)  
unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 60  
Sekunden, 50°C für 90 Sekunden und 72°C für 2 Minuten.

30

Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-  
Fragmente mit dem QIAExII Gelextraktionskit (Qiagen)

nach Angaben des Herstellers aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, blunt-end mit Hilfe des Sure Clone-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Die Plasmide  
5 wurden durch Restriktionskartierung auf Richtigkeit überprüft. Diese Klonierung erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup> (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645-4649).

10

Anschließend wurde das *serA*-Gen und die *serA*-Deletionskonstrukte in den *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, *Appl Environ Microbiol* 55(3): 684-688) kloniert. Der  
15 Vektor vermittelt eine Kanamycin-Resistenz. Hierzu wurden die Inserts der Deletionskonstrukte jeweils mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Bam*HI aus dem pUC18-Vektor ausgeschnitten. Die überhängenden DNA-Enden wurden mittels Klenow-Behandlung aufgefüllt und die Frag-  
20 mente wurden blunt-end in den *Sca*I-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Das Wild Typ *serA*-Gen wurde nach *Eco*RI-Restriktion ebenfalls Klenow behandelt und blunt-end in den *Sca*I-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden pZ1*serA* (Abb. 3), pZ1*serA* $\Delta$ 79  
25 (Abb. 4), pZ1*serA* $\Delta$ 188 (Abb. 5), pZ1*serA* $\Delta$ 197 (Abb. 6), pZ1*serA* $\Delta$ 205 (Abb. 7) und pZ1*serA* $\Delta$ 211 (Abb. 8) genannt.

## 2. Überexpression des Wild Typ *serA*-Gens sowie der verkürzten *serA*-Allele in *C. glutamicum*

30

Die Plasmide pZ1*serA*, pZ1*serA* $\Delta$ 79, pZ1*serA* $\Delta$ 188  
pZ1*serA* $\Delta$ 197 pZ1*serA* $\Delta$ 205 und pZ1*serA* $\Delta$ 211 wurden durch

Elektroporation einzeln in *C. glutamicum* eingebracht.

Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pZ1 ebenfalls nach *C. glutamicum* ATCC 13032 elektroporiert. Die so erhal-

tenen Stämme 13032pZ1, 13032pZ1serA, 13032pZ1serAA79,

5 13032pZ1serAA188, 13032pZ1serAA197, 13032pZ1serAA205

und 13032pZ1serAA211 wurden dann auf Überexpression der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mittels 3-Phospho-

glycerat-Dehydrogenase-Enzymtest analysiert. Hierzu

wurden die sechs Stämme in Komplexmedium (CgIII = 2,5 g

10 NaCl, 10 g Bacto-Peptide, 10 g Bacto-Yeast Extract, pH

7,4 mit 2 % Glukose) gezüchtet, und das Minimalmedium

CGXII jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das

Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. be-

schriebenen Medium CGXII (Journal of Bacteriology

15 (1993) 175: 5593-5603), enthielt aber zusätzlich 25

µg/mL Kanamycin. Die Zusammensetzung des von Keilhauer

et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 darge-

stellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
$\text{CaCl}_2$	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
$\text{CuSO}_4$	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei  $\text{OD}_{600}$  von 5 bis 8 geerntet und zweimal in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen. Die Zellpellets wurden anschliessend bis zum Aufschluss bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Die eingefrorenen Zellpellets wurden dann auf Eis aufgetaut und mit 2 ml kaltem 100 mM Tris-HCl pH 7,5/10 % Glycerin resuspendiert und in einem Brenson Sonifier 10 min aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei 13000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  in einer Sigma -202 MK Zentrifuge abgetrennt. Die so erhaltenen Überstände wurden als Rohextrakte zunächst über eine PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt und dann sofort in die En-



zymmessung eingesetzt. Der Enzymtest beruht auf dem photometrischen Nachweis der Bildung von NADH in der Reaktion 3-Phosphoglycerat und NAD zu Phosphohydroxypyruvat zu NADH. Der Testansatz ist in Tabelle 2 dargestellt:

Tabelle 2: Komponenten des Testansatzes zur Bestimmung der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris-HCl; pH 8.8	500 mM	100 mM
Dithiothreitol	100 mM	1 mM
EDTA	500 mM	5 mM
Hydrazin	250 mM	10 mM
NAD	20 mg/ml	2 mg/ml
RE	ca. 2 mg/ml	ca. 200 µg Protein
3-Phosphoglycerat	150 mM	15 mM

Mit diesem Testansatz konnte für die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs eine spezifische Aktivität von ca. 150 mU/mg Protein bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Überexpression des vollständigen *serA*-Gens eine etwa 16-fache Steigerung der spezifischen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität ergibt. Das Konstrukt *serAA197* ermöglichte eine 10-fache Überexpression gegenüber dem Wild Typ-Protein. Die Konstrukte *serAA188* und *serAA205* lassen sich 3 bis 3,4-fach überexprimieren, wohingegen für die Konstrukte *serAA205* und *serAA79* nur eine 1,2 bis 1,5-fache Überexpression möglich war. Damit ist gezeigt, dass das durch Deletion der C-terminalen 197 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugte Mutein Se-

rAA197 funktionell ist, und mehr als 60 % der Wild Typ Aktivität aufweist.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

5

Tabelle 3: Überexpression des *serA*-Gens sowie der C-terminal verkürzten *serA*-Allele.

Stämme	spez. PGD-Aktivität [U/mg Protein]	Faktor der Überexpression
13032pZ1	130	1.0
13032pZ1 <i>serA</i>	2140	16.5
13032pZ1 <i>serAA</i> 79	190	1.5
13032pZ1 <i>serAA</i> 188	440	3.4
13032pZ1 <i>serAA</i> 197	1320	10.0
13032pZ1 <i>serAA</i> 205	390	3.0
13032pZ1 <i>serAA</i> 211	150	1.2

\* Die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität im Stamm 13032pZ1 wurde auf 1,0 normiert

10

### 3. Untersuchungen zur Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* und des C-terminal verkürzten Muteins *SerAA*197 durch L-Serin

15

Im Folgenden wurde getestet, ob das um den C-Terminus verkürzte Mutein *SerAA*197 nicht mehr durch L-Serin ge-

hemmt werden kann. Dazu wurde zunächst die Hemmbarkeit der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* durch L-Serin anhand des oben beschriebenen Enzymtests untersucht.

- 5 Hierzu wurden dem Testansatz zusätzlich 1, 5 und 10 mM L-Serin zugesetzt und 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 15 mM 3-Phosphoglycerat gestartet. Die Inkubation war notwendig um eine Hemmung nachweisen zu können (Tab. 4). Diese Zeitabhängigkeit der L-Serin-Hemmung, die mehrere Minuten Inkubation benötigt, bevor ein konstanter Level der Inhibition erreicht wird, wurde auch schon für andere 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, z. B. für das aufgereinigte Enzym von *B. subtilis* beschrieben (Saski R. 10 und Pitzer L., 1975, *Eur. J. Biochem.*, 51:415-427).

Tabelle 4: Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* durch L-Serin

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%]	
	ohne Inkubation	5-minütige Inkubation bei 30°C
0	100*	100*
1	106	96
5	112	82
10	104	56

- 20 \* Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt.

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde die L-Serin-Inhibition der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAA $\Delta$ 197 untersucht. Es zeigte sich, dass tatsächlich das C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein nicht mehr signifikant durch L-Serin gehemmt werden kann (Tab. 5).

Tabelle 5: Inhibition der überexprimierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch L-Serin in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAA $\Delta$ 197

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%] **	
	13032pZ1serA	13032pZ1serAA $\Delta$ 197
0	100*	100*
10	34	95

\* Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt

\*\* Bestimmung der Aktivität nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C mit und ohne L-Serin

Damit ist es gelungen, durch Deletion des C-Terminus der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* gezielt ein dereguliertes 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein zu generieren.

4. Gesteigerte Akkumulation von L-Serin durch Überexpression des Gens für die deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (serAA $\Delta$ 197)

- Zur Analyse der L-Serinausscheidung des Stammes mit deregulierter 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wurden die Plasmide pZ1, pZ1serA und pZ1serAA197 in den Stamm *Corynebacterium glutamicum* 13032 $\Delta$ panBC transformiert (E. Radmacher, A. Vaitsova, U. Burger, K. Krumbach, H. Sahm, L. Eggeling, 2002, *Appl. Environ. Microbiol.* (Publikation in Vorbereitung)). Dieser Stamm ist durch die Deletion der Pantothenat-Biosynthese Gene *panB* und *panC* Pantothenat-auxotroph, und zeichnet sich dadurch aus, dass er unter Pantothenat-Limitation aufgrund einer verstärkten Akkumulation von Pyruvat ca. 50 mM Alanin und 8 mM Valin ausscheidet. Darüberhinaus bildet der Stamm ca. 100  $\mu$ M L-Serin und eignet sich somit als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines L-Serinproduzenten. Der Stamm mit dem Plasmid pZ1serA transformierte Stamm 13032 $\Delta$ panBCpZ1serA wurde gemäß Budapester Vertrag am 11.04.2002 bei der DSMZ unter der DSM Nr. 14922 hinterlegt.
- Zur Untersuchung der L-Serinausscheidung wurden die drei Stämme in Komplexmedium (CgIII mit 2% Glukose und mit 50  $\mu$ g/l Kanamycin) gezüchtet, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) jeweils aus den Vorkulturen beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 50  $\mu$ g/l Kanamycin und 1  $\mu$ M Pantothenat. Es wurden zwei unabhängige Fermentationen durchgeführt. Nach Kultivierung für 24 bzw. 35 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte L-Serinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitchromatographie (J Chromat (1983) 266: 471-482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 6

dargestellt, und es zeigt sich, daß schon die Über-  
expression des Wiltyp *serA*-Gens eine ca. 10%ige Steige-  
rung der L-Serin-Akkumulation im Medium hervorruft. Die  
Überexpression der deregulierten 3-Phosphoglycerat-  
5 Dehydrogenase erzielt dagegen sogar eine Steigerung von  
bis zu 40% im Vergleich zum Kontrollstamm der nur das  
Leerplasmid trägt. Somit stellt die Nutzung des kon-  
struierten und beschriebenen Gens für das deregulierte  
L-Serin-Biosynthese Enzym 3-Phosphoglycerat-Dehydro-  
10 genase ein Verfahren dar, um die L-Serinbildung ent-  
scheidend zu verbessern.

Tabelle 6: Akkumulation von L-Serin im Kulturüber-  
stand von *Corynebacterium glutamicum*  
15 13032 $\Delta$ panBC nach Expression der Gene *se-*  
*rA* bzw. *serAA197*

Stamm	t [h]	TG [mg/ml]	L- Serin [ $\mu$ M]	L- Serin/TG [mg/g]
13032DpanBCpZ1	24	18,3	164	0,9
13032DpanBCpZ1 <i>serA</i>	24	14,7	163	1,2
13032DpanBCpZ1 <i>serAA197</i>	24	16,5	199	1,3

\* TG = Zelltrockengewicht

## P a t e n t a n s p r ü c h e

---

1. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen  
*serA* gemäß SEQ ID No 1 oder ein Allel, Homolog oder  
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser  
hybridisierende Nukleotidsequenzen.  
5
2. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen  
*serA* gemäß SEQ ID No 2 oder ein Allel, Homolog oder  
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser  
hybridisierende Nukleotidsequenzen.  
10
3. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen  
*serA* gemäß SEQ ID No 3 oder ein Allel, Homolog oder  
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser  
hybridisierende Nukleotidsequenzen.  
15
4. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen  
*serA* gemäß SEQ ID No 4 oder ein Allel, Homolog oder  
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser  
hybridisierende Nukleotidsequenzen.  
20
5. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen  
*serA* gemäß SEQ ID No 5 oder ein Allel, Homolog oder  
Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser  
hybridisierende Nukleotidsequenzen.  
25
6. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,

dass sie aus coryneformen Bakterien isoliert werden.

7. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet,  
5 dass sie aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* isoliert werden.
8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet,  
10 dass sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* isoliert werden.
9. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
10. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz  
15 gemäß Anspruch 1 bis 8 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 9 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
11. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase oder  
20 ein Teil davon, codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
12. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach  
Anspruch 11,  
mit einer Aminosäuresequenz,  
25 gemäß SEQ ID No 7 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.
13. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach  
Anspruch 11,  
mit einer Aminosäuresequenz,



gemäß SEQ ID No 8 oder einer modifizierten Form  
dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.

14. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach  
Anspruch 11,\*

5 mit einer Aminosäuresequenz,  
gemäß SEQ ID No 9 oder einer modifizierten Form  
dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.

15. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach  
Anspruch 11,

10 mit einer Aminosäuresequenz,  
gemäß SEQ ID No 10 oder einer modifizierten Form  
dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.

16. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach  
Anspruch 11,

15 mit einer Aminosäuresequenz,  
gemäß SEQ ID No 11 oder einer modifizierten Form  
dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.

17. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 16,  
dadurch gekennzeichnet,

20 daß sie aus coryneformen Bakterien stammen.

18. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 17,  
dadurch gekennzeichnet,

daß sie aus Corynebacterium oder Brevibacterium  
stammen.

25 19. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet,

daß sie aus Corynebacterium glutamicum oder Brevi-  
bacterium flavum stammen.

20. Mikroorganismus enthaltend wenigstens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 8 in replizierbarer Form, welche im Vergleich zum Wild Typ Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.
21. Mikroorganismus gemäß Anspruch 20 enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur gemäß Anspruch 9 oder einen Vektor gemäß Anspruch 10.
22. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21 enthaltend wenigstens ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 bis 19, welcher eine im Vergleich zu dem entsprechenden Wild Typ Stamm aktive deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aufweist.
23. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass er ein coryneformes Bakterium ist.
24. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass er zur Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium gehört.
25. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass er zu Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium flavum gehört.
26. Sonde zur Identifizierung und /oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligten Proteinen, dadurch gekennzeichnet,

dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.

27. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin,  
5 dadurch gekennzeichnet, daß

a) wenigstens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 isoliert aus einem coryneformen Bakterium in einen Mikroorganismus übertragen wird und dort exprimiert wird, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des entsprechend codierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist,  
10

b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt b) zur mikrobiellen Herstellung eingesetzt wird und  
15

c) das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

## Z u s a m m e n f a s s u n g

Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für  
an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine so-  
wie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

---

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer  
Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin  
beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von  
5 L-Serin.

Durch Deletion von mindestens 79 Aminosäuren im  
C-Terminus der Wild Typ *serA* Sequenz konnte eine  
3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer gegenüber dem  
Wild Typ verringerten Feedback Inhibition durch L-Serin  
10 erzeugt werden.

42

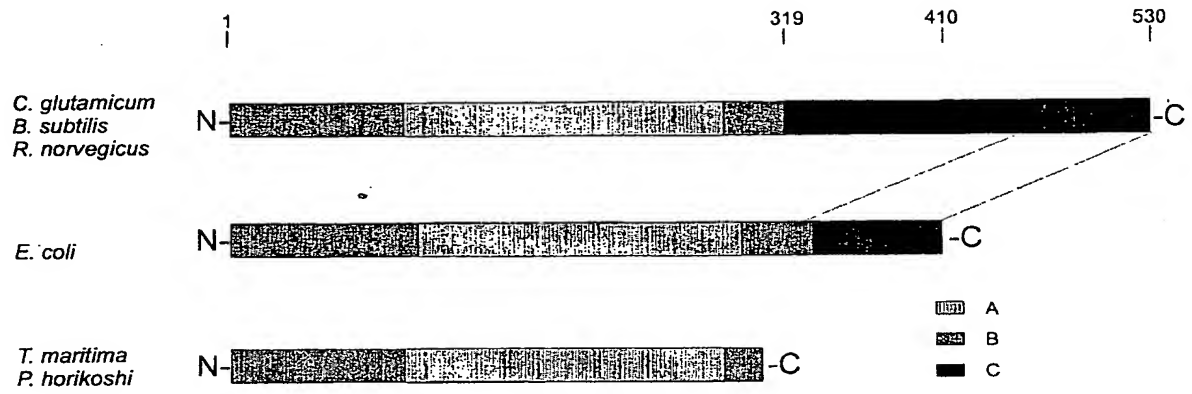


Fig. 1

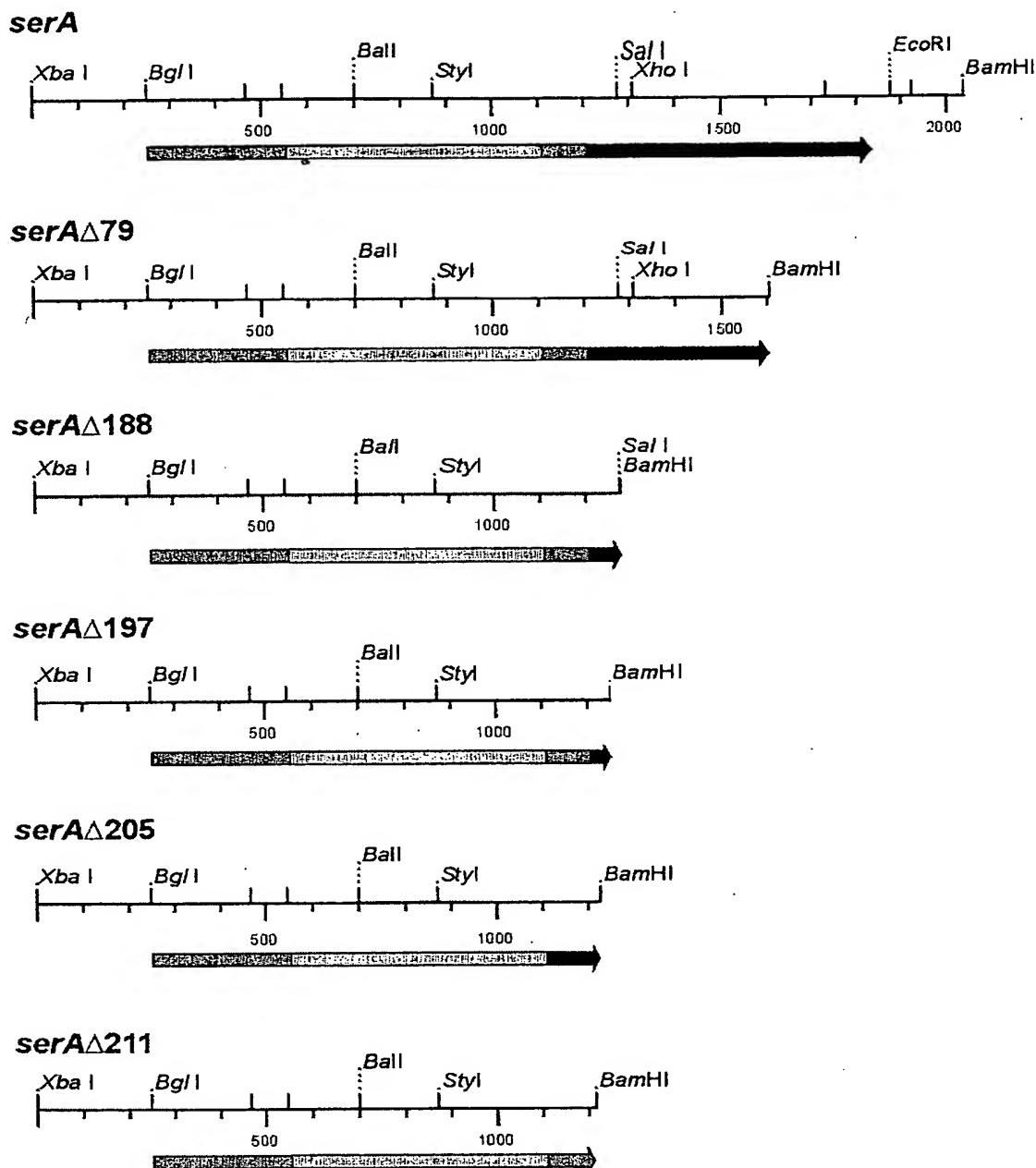


Fig. 2

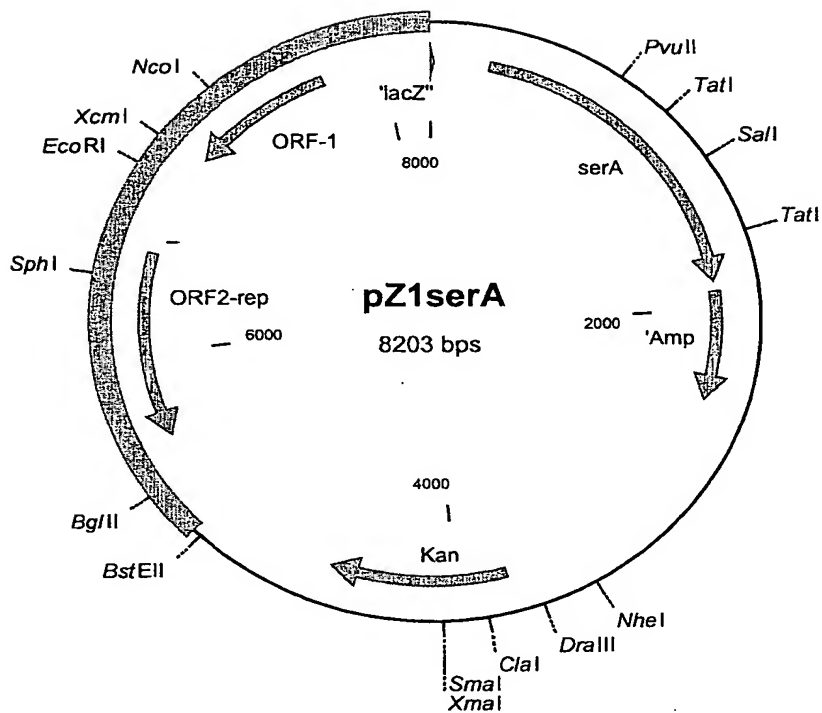


Fig. 3

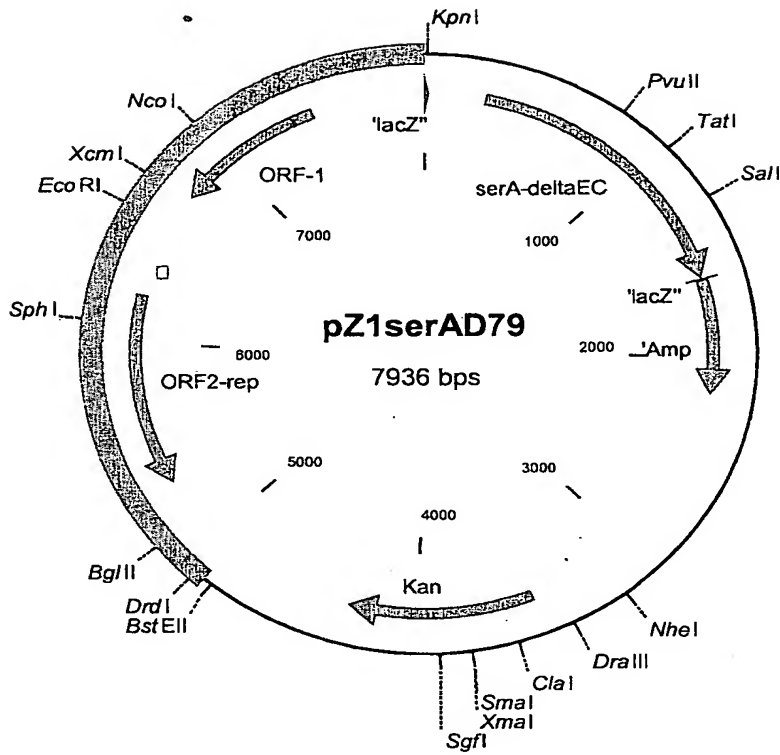


Fig. 4



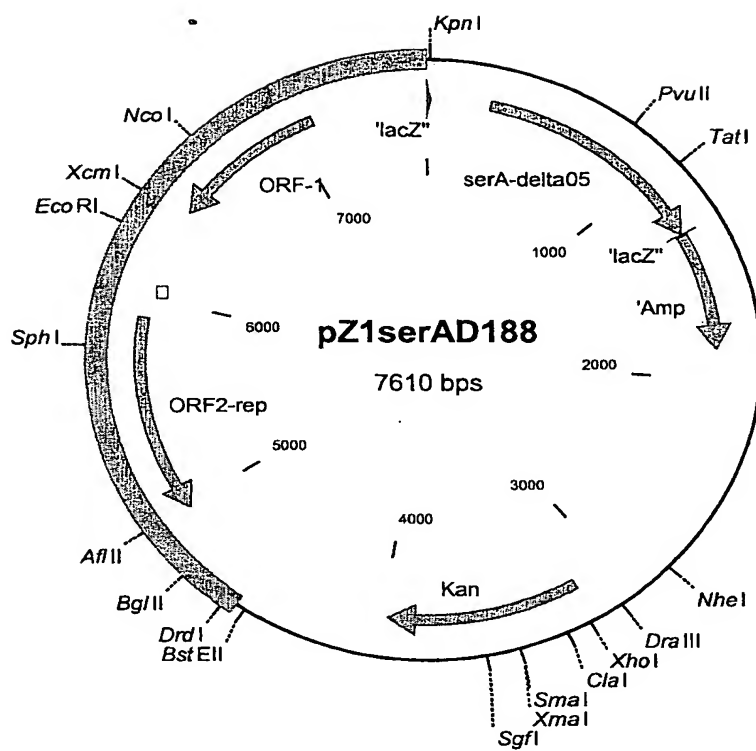


Fig. 5

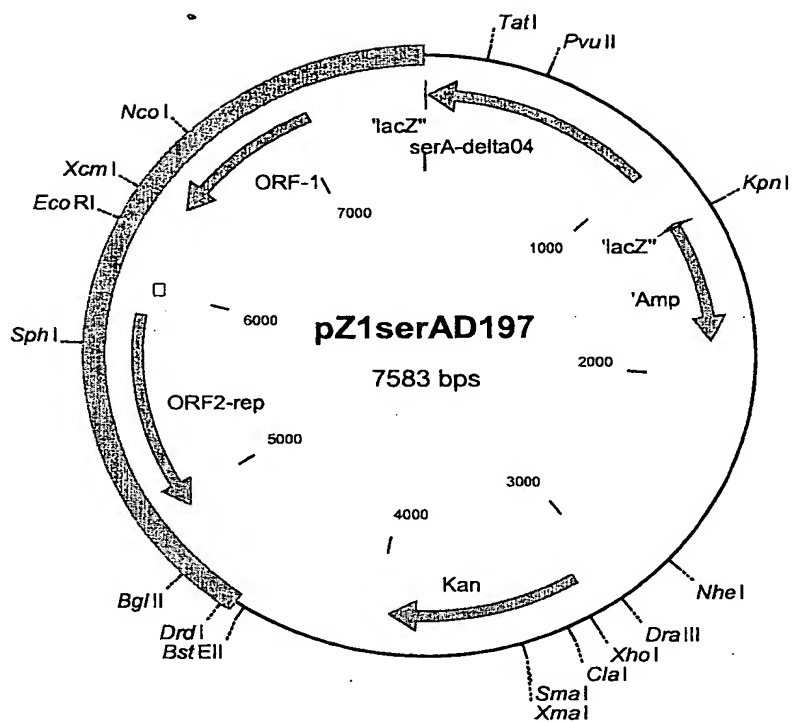


Fig. 6

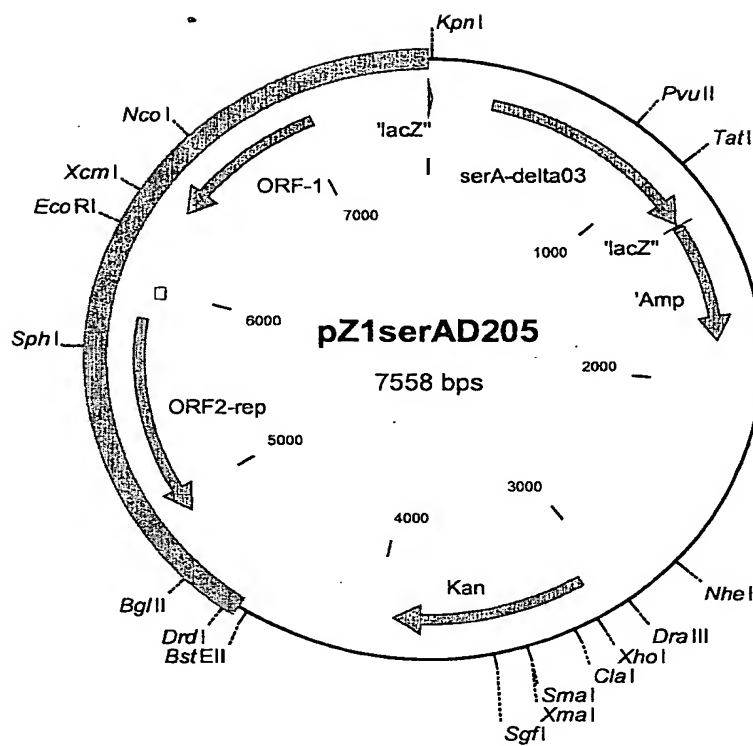


Fig. 7

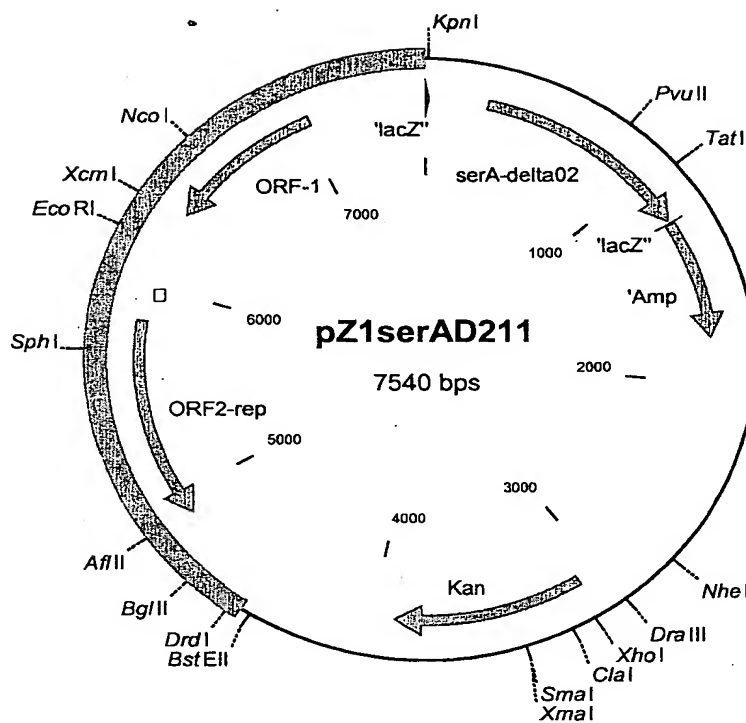


Fig. 8